



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101718779 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910114505.X

(22) 申请日 2009.10.29

(71) 申请人 广西师范大学

地址 541004 广西壮族自治区桂林市育才路
15号

(72) 发明人 梁爱惠 韦丽丽 张静 蒋治良

(74) 专利代理机构 桂林市华杰专利商标事务所
有限责任公司 45112

代理人 罗玉荣 周兆阳

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/47(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

检测人血清铜蓝蛋白的免疫纳米金同步散射
光谱试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测人血清铜蓝蛋白的免疫纳米金同步散射光谱试剂盒及其使用方法。本试剂盒由下述三种试剂组成,其中试剂1含0.001-0.20mol/L 枸橼酸、0.1-0.3mol/L 磷酸氢二钠溶液和100-400g/L PEG 6000 增敏剂;试剂2含50-200g/L PEG 20000 稳定剂和30-60 μ g/mL 纳米金标记羊抗人铜蓝蛋白(AuGCP)抗体;试剂3为校准品:铜蓝蛋白(CP)标准品溶液。具体使用方法是先绘制同步散射强度-浓度标准曲线;然后按测定样品的同步散射强度,根据标准曲线求出其CP含量。本试剂盒操作简便、快速,灵敏度高,特异性强。

1. 检测人血清铜蓝蛋白的免疫纳米金同步散射光谱试剂盒,其特征是:它由下述三种试剂组成,其中试剂1含0.001-0.20mol/L 枸橼酸、0.1-0.3mol/L 磷酸氢二钠溶液和100-400g/LPEG 6000 增敏剂;试剂2含50-200g/L PEG 20000 稳定剂和30-60 μ g/mL 纳米金标记羊抗人铜蓝蛋白(AuGCP) 抗体;试剂3为校准品:铜蓝蛋白(CP) 标准品溶液。

2. 权利要求1所述试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

(1) 绘制标准曲线:

1) 准备8支试管,各试管依次加入不同体积的试剂3,第一管不加标样作为空白对照管,每支试管加入600 μ L 试剂1,混匀,每支试管加入640 μ L 试剂2,混匀;

2) 每支试管加入蒸馏水定容,使每根试管溶液最终体积为3.0mL,混匀后,在超声波清洗仪中反应20min,取适量置于石英比色皿中,于荧光分光光度计上,在激发波长等于发射波长的条件下同步扫描,得到体系的同步散射光谱,测定同步散射峰处的同步散射光强度I,不加CP作空白,测其同步散射光强度 I_0 ;

3) 计算方法:多点标准曲线法,以第一管同步散射光强度作为试剂空白值 I_0 ,每一个样品的同步散射值为I,最终同步散射值按公式 $\Delta I = I - I_0$ 计算;

4) 以浓度C-最终同步散射值 ΔI 绘制标准曲线;

(2) 按步骤(1)的方法制备样品测试体系,加入的是未知浓度的被测样品,并测其共振散射光谱值 $\Delta I_{\text{样}}$;

(3) 样品测得的最终同步散射值参照标准曲线,得到浓度值。

3. 根据权利要求2所述的使用方法,其特征是:步骤(1)中所述的标准曲线线性范围为0.010-1.56 μ g/mL;相关系数 ≥ 0.9998 ;检出限为1.0ng/mL。

检测人血清铜蓝蛋白的免疫纳米金同步散射光谱试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生化分析技术,具体是检测人血清铜蓝蛋白的免疫纳米金同步散射光谱试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 铜蓝蛋白 (Ceruloplosmin ;简称 CP) 是一种含铜的 α_2 -糖蛋白,也是由肝脏合成的一种糖蛋白。它为一个单链多肽,含糖约 10%,由 8 个分子量 1.8 万的亚基组成,分子量约为 12 万-16 万,每个 CP 分子可牢固地结合 6~8 个铜离子,由于含铜而呈蓝色,是体内唯一的蓝色蛋白质。CP 是存在于人类及脊椎动物的唯一的多铜氧化酶,具有氧化酶的活性,对多酚及多胺类底物有催化其氧化的能力,因此又称氧化铜酶。最近研究认为 CP 主要作用是催化二价铁成为三价铁,利用铁掺入铁转运蛋白,促进铁运输。也有人认为 CP 是一种抗氧化剂,能清除体内的超氧化物自由基,在血循环中 CP 的抗氧化活力可以防止组织中脂质过氧化物和自由基的生成,在维持机体内环境的平衡及保障机体正常功能等方面均有十分重要的作用。CP 属于一种急性时相反应蛋白,在许多疾病的临床诊断监测上应用很广,测定其含量不仅能了解铜代谢的生理和病理变化,且对某些疾病的诊断与鉴别诊断有重要意义。在妇女妊娠期、感染、创伤和肿瘤时血浆 CP 增加。当患者血浆 CP 含量明显下降时,它是协助诊断 Wilson 病的重要指标。在营养不良、严重肝病及肾病综合征时,血浆 CP 亦往往下降。目前,CP 的检测主要有酶催化法和免疫法。根据 CP 氧化酶特性,用对苯二胺 (PPD) 作为底物建立了测定 CP 的比色法 (PPD) 法,但是 PPD 法对 CP 是非专一性的,游离的金属如铜和铁离子均可催化底物的氧化作用,导致结果假增高。针对上述方法存在的问题, Schosinsky 等人以邻联大茴香胺作为底物对此法作了改进。由于邻联大茴香胺比 PPD 稳定,能形成更稳定的产物,成为优先选择的酶催化比色法。免疫反应具有高度特异性,在生化分析中得到广泛应用,并发展了放射性、荧光、酶标记分析法。测定 CP 的免疫学方法主要有免疫比浊法、免疫电扩散法 (EIA,即火箭电泳法)、放射免疫扩散法 (RID)、动力学比浊法、放射免疫双抗体分析法等。在这些方法中,免疫比浊法较快速、操作简单,缺点是抗血清的用量较大且对纯度的要求高。免疫电扩散法所需的血清用量少 (5~10 μ L),专一性强,在这个方法中免疫扩散和电泳同时进行,所以琼脂糖板与电泳条件要严格控制一致,否则板间的重复性较差,而且要提纯铜蓝蛋白和制备特异的高效价的铜蓝蛋白抗血清。

[0003] 金纳米微粒具有特异的理化特性、高电子密度、较好生物相容性,已成为第四大标记物,已用于光镜和电镜水平的免疫组织化研究,及免疫金标分析等。目前金标免疫分析的检测技术主要有光度法、发光法、质谱法、同步散射光谱法、电化学法等。同步散射光谱法具有灵敏、简便快速等特点,已用于测定痕量无机物和有机物。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种灵敏度高、特异性强、快速定量检测人血清铜蓝蛋白的

免疫纳米金同步散射光谱试剂盒及其使用方法。

[0005] 本发明利用纳米金具有高电子密度,易与蛋白质等生物大分子结合的特点,将纳米金标记羊抗人铜蓝蛋白(GCP)获得金标记免疫探针(AuGCP)。在一定浓度范围内,随着CP浓度的增加,释放的金颗粒越多,金颗粒聚集的程度越强,使得体系同步散射峰急剧增强的原理,增强的同步散射强度增强值与CP浓度成正比,通过测定同步散射强度增强值,可对照标准曲线确定样品中CP含量的原理,制备了一种定量检测人血清中铜蓝蛋白(CP)的免疫金同步散射光谱试剂盒。

[0006] 本发明试剂盒由下述三种试剂组成:

[0007] 其中试剂1含0.001-0.20mol/L枸橼酸、0.1-0.3mol/L磷酸氢二钠溶液和100-400g/L PEG6000增敏剂;

[0008] 试剂2含50-200g/L PEG 20000稳定剂和30-60 μ g/mL纳米金标记羊抗人铜蓝蛋白(AuGCP)抗体;

[0009] 试剂3为校准品:铜蓝蛋白(CP)标准品溶液。

[0010] 使用免疫纳米金同步散射光谱试剂盒检测人血清铜蓝蛋白的测定方法步骤如下:

[0011] (1) 制定标准曲线

[0012] 1) 准备8支试管,各试管依次加入不同体积的试剂3,第一管不加标样作为空白对照管,每支试管加入600 μ L试剂1,混匀,每支试管加入640 μ L试剂2,混匀;

[0013] 2) 每支试管加入蒸馏水定容,使每根试管溶液最终体积为3.0mL,混匀后,在超声波清洗仪中孵育20min后,取适量于石英池中,置于荧光分光光度计上,在激发波长等于发射波长的条件下同步扫描,得到体系的同步散射光谱。测定同步散射峰处的同步散射光强度I,不加CP作空白,测其同步散射光强度 I_0 ;

[0014] 3) 多点标准曲线法计算:以第一管同步散射光强度作为试剂空白值 I_0 ,每一个样品的同步散射值为I,最终同步散射值按下式计算:

[0015] 最终同步散射值 $\Delta I = I - I_0$;

[0016] 4) 以浓度C-最终同步散射值 ΔI 绘制标准曲线;

[0017] (2) 按步骤(1)的方法制备样品测试体系,加入试管的是未知浓度的样品,并测其共振散射光谱值 $\Delta I_{\text{样}}$;

[0018] (3) 样品测得的最终同步散射值参照标准曲线,得到浓度值。

[0019] 本发明主要技术指标:

[0020] 1、本试剂盒测定的线性范围为0.010-1.56 μ g/mL;相关系数 ≥ 0.9998 ;检出限为1.0ng/mL。

[0021] 本试剂盒储存与有效期:试剂避光储存于4 $^{\circ}$ C冰箱中,可稳定半年。

[0022] 本试剂盒操作简便、快速、灵敏度高、特异性强、检测浓度范围宽,不需繁琐的相分离步骤,样品消耗量少,仅需几微升,适用于大多数生物样品分析。

具体实施方式

[0023] 下面结合实施例对本发明作进一步的阐述:

[0024] 主要仪器和试剂:

[0025] 5 mL 刻度试管 ;可加 10 ~ 1000 μ L 的移液器 ;LS-55 型荧光分光光度计 (PE 公司) ;SK1200H 超声波清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司)。

[0026] 铜蓝蛋白 (CP) 标准品 (400mg/mL, 上海沪尚生物科技有限公司) ;羊抗人铜蓝蛋白 (GCP) (滴度 1 : 33, 上海沪尚生物科技有限公司) ;0. 20mol/L Na_2HPO_4 溶液 ;0. 10mol/L 枸橼酸溶液 ;58. 0 μ g/mL 粒径为 15nm 的纳米金溶液 (上海沪正纳米科技有限公司) ;100g/L KCl 溶液 ;0. 2mol/L 的 K_2CO_3 溶液 ;聚乙二醇 6000 (PEG-6000), 聚乙二醇 20000 (PEG-20000) (阿法埃莎天津化学有限公司)。所用试剂均为分析纯级, 实验用水为二次蒸馏水。

[0027] 试剂 1 的制备 :取 0. 20mol/L Na_2HPO_4 溶液 19. 15mL, 0. 10mol/L 枸橼酸溶液 0. 85mL, 以及 333g/L PEG-6000 溶液 20mL, 混匀, 即制得试剂 1。

[0028] 试剂 2 的制备 :取纳米金溶液 100mL, 用 2. 0mL 0. 2mol/L 的 K_2CO_3 溶液调 pH 为 8. 5, 滴加 0. 12mL 的 GCP, 再加入 3. 6mL 150g/L 的 PEG-20000 作为稳定剂, 并加入 100g/L KCl 溶液 10mL, 搅匀后, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0029] 试剂 3 的制备 :取 400mg/mL 的 CP 标准品 100 μ L, 置于 10mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀 ;移取 300 μ L, 置于 100mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀, 即得浓度为 12 μ g/mL 的 CP 标准工作液。

[0030] (1) 标准曲线的制作 :

[0031] 1) 准备 8 支试管, 依次加入 0、5、50、100、150、200、300、375 μ L 试剂 3, 其中第一管不加 CP 作为空白对照管, 每支试管加入 600 μ L 试剂 1, 混匀, 每支试管加入 640 μ L 试剂 2, 混匀 ;

[0032] 2) 每支试管加水定容至 3. 0mL, 混匀后, 在超声波清洗仪中孵育 20min, 取适量于石英比色皿中, 置于荧光分光光度计上, 在激发波长等于发射波长的条件下同步扫描, 得到体系的同步散射光谱, 确定同步散射测量波长为 550nm, 测定 550nm 同步散射峰的散射光强度 I, 不加 CP 作空白, 测其同步散射光强度 I_0 ;

[0033] 3) 以第一管同步散射光强度作为试剂空白值 I_0 , 每一个样品的同步散射值为 I, 最终同步散射值按下式计算 :

[0034] 最终同步散射值 $\Delta I = I - I_0$;

[0035] 4) 以浓度 C- 最终同步散射值 ΔI 绘制标准曲线, 其回归方程为 $\Delta I = 102. 3 C + 1. 6$, 线性范围为 0. 010-1. 56 μ g/mL, 相关系数为 0. 9998 ;

[0036] (2) 样品测定 :将血清稀释至线性范围内, 取血清代替 CP 进行测定, 其余操作同标准一样, 求样品的 $\Delta I_{\text{样}}$, 结果参照标准曲线获得浓度 ;

[0037] (3) 样品测得的最终同步散射值参照标准曲线, 得到最终浓度值。

[0038] 本发明检出限为 1. 0 μ g/mL。

[0039] 实施例和验证 :

[0040] 从医院取正常人血清 10 份, 用水将人血清稀释 20 倍, 取稀释后的各样品 50 μ L, 按上述步骤测定, 测定结果为 203、235、336、355、364、403、469、471、519、522 μ g/mL, 与正常人血清 CP 含量 200-600 μ g/mL 基本一致。在置信水平为 95% 时, 用本试剂盒测定血清中 CP 的含量与免疫比浊法的测定结果比较吻合。

专利名称(译)	检测人血清铜蓝蛋白的免疫纳米金同步散射光谱试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN101718779A	公开(公告)日	2010-06-02
申请号	CN200910114505.X	申请日	2009-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	广西师范大学		
申请(专利权)人(译)	广西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西师范大学		
[标]发明人	梁爱惠 韦丽丽 张静 蒋治良		
发明人	梁爱惠 韦丽丽 张静 蒋治良		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N21/64 G01N21/47		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测人血清铜蓝蛋白的免疫纳米金同步散射光谱试剂盒及其使用方法。本试剂盒由下述三种试剂组成，其中试剂1含0.001-0.20mol/L枸橼酸、0.1-0.3mol/L磷酸氢二钠溶液和100-400g/L PEG 6000增敏剂；试剂2含50-200g/L PEG 20000稳定剂和30-60μg/mL纳米金标记羊抗人铜蓝蛋白(AuGCP)抗体；试剂3为校准品：铜蓝蛋白(CP)标准品溶液。具体使用方法是先绘制同步散射强度-浓度标准曲线；然后按测定样品的同步散射强度，根据标准曲线求出其CP含量。本试剂盒操作简便、快速，灵敏度高，特异性强。